石韦不同极性萃取物体外降血糖活性研究

庄远杯 [1,2]，凌梅娣 [2]，魏爱红 [1,2]，李榕娣 [1,2]，刘小敏 [1,2]，聂华 [1,2]，张声源 [1,2*]
（1. 嘉应学院 广东省山区特色农业资源保护与精准利用重点实验室，广东 梅州 514015；
2.嘉应学院 医学院 客家药用生物资源研究所，广东 梅州 514031）

摘要：以石韦 95%乙醇提取物的不同极性萃取物为试材，阿卡波糖为阳性对照，采用 pNPG 法（p-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside, pNPG）、DNS 法（3,5-dinitro salicylic acid, DNS）考察石韦不同极性萃取物的 α-葡萄糖苷酶和 α-淀粉酶抑制活性，并采用酶促动力学方法与 Lineweaver-Burk 曲线分析最强活性萃取物对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用类型，以期为石韦的进一步开发利用提供科学依据。结果表明：石韦水萃取物对 α-葡萄糖苷酶和 α-淀粉酶的抑制作用最强，其 IC_{50} 值分别为（4.71 ± 0.72）μg·mL^{-1}、IC_{50} =（48.40 ± 0.32）μg·mL^{-1}，并显著强于其他萃取物（P＜0.05），且对 α-葡萄糖苷酶抑制作用比阿卡波糖强，对 α-淀粉酶抑制作用弱于阿卡波糖。阿卡波糖对 α-葡萄糖苷酶和 α-淀粉酶的抑制作用的 IC_{50} 值分别为（2 857.36 ± 1.35）μg·mL^{-1}、（16.41 ± 0.63）μg·mL^{-1}。酶促动力学显示水萃取物对 α-葡萄糖苷酶为可逆性抑制，Lineweaver-Burk 曲线显示为竞争性抑制。综上结果显示，石韦水萃取物具有较好的 α-葡萄糖苷酶和 α-淀粉酶抑制活性，是一种胃肠道副作用小、天然的 α-葡萄糖苷酶抑制剂来源。

关键词：石韦，α-葡萄糖苷酶，α-淀粉酶，阿卡波糖，提取物
中图分类号：Q946　　　**文献标识码：**A

The hypoglycemic activities of different solvent extracts from *Pyrrosia lingua* (Thunb.) Farwell *in vitro*

ZHUANG Yuanbei [1,2], LIN Meidi[1], WEI Aihong[1,2], LI Rongdi[1,2], LIU Xiaomin[1,2], NIE Hua[1,2], ZHANG Shengyuan[1,2*]
(1. *Guangdong Provincial Key Laboratory of Conservation and Precision Utilization of Characteristic Agricultural Resources in Mountainous Areas,* Meizhou 514015, Guangdong, China; 2. *Institute of Hakka Medicinal Bio-resources, Medical College, Jiaying University,* Meizhou 514031, Guangdong, China)

Abstract: In order to provide scientific basis for the further development and utilization of *Pyrrosia lingua*, the α-glucosidase and α-amylase inhibitory activities of different polar extracts of 95% ethanol extracts of *Pyrrosia lingua* were investigated by using p-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside (pNPG) and DNS (3,5-dinitro salicylic acid (DNS) methods

收稿日期：2020-08-31

基金项目：国家自然科学基金青年基金（81703662）；广东省科技计划项目（2020B121201013）；梅州市医药卫生科研课题(2019-B-10)；梅州市社会发展科技计划项目 (2018B057)；广东省高等教育" 冲补强" 提升计划重点建设学科(农业资源与环境)建设项目（粤教科函[2018]181 号）；广东省大学生创新创业项目(201910582267) [Supported by the National Natural Science Foundation of China（81703662）；Science and Technology Program of Guangdong Province（2020B121201013）；Medical and Health Research Program of Meizhou (2019-B-10)；Social Development Science and Technology Program of Meizhou(2018B057)；Promotion Program of Higher Education in Guangdong Province about Key Construction Subjects (Agricultural Resources and Environment) (Guangdong Science and Education Letter [2018] NO.181；Guangdong University Student Innovation and Entrepreneurship Project (201910582267)]。

作者简介：庄远杯（1994- ），实验员，从事天然产物研究与开发，（E-mail）1294632773@qq.com。
*通讯作者：张声源，博士，副教授，研究方向为中药及天然药物活性成分研究，（E-mail）mcdullzhang@yeah.net。

with acarbose as positive control. Enzyme kinetics method and Lineweaver-Burk curve were used to analyze the types of inhibition of α-glucosidase for the most active extract. The results showed that the IC_{50} values of the water extract were（4.71 ± 0.72）μg·mL^{-1} for α-glucosidase and（48.40 ± 0.32）μg·mL^{-1} for α-amylase respectively, which were significantly stronger than those of the other extracts ($P < 0.05$). The inhibition of α-glucosidase was stronger than that of acarbose, while the inhibition of α-amylase was weaker than that of acarbose. The IC_{50} values of acarbose on α-glucosidase and α-amylase were （2 857.36 ± 1.35） μg·mL^{-1} and （16.41 ± 0.63）μg·mL^{-1}, respectively. The enzymatic kinetics showed that the inhibitory type on α-glucosidase of water extract was reversible inhibition, while the Lineweaver-Burk curve showed a competitive inhibition. In conclusion, the water extract from *Pyrrosia lingua* displayed potential inhibitory activity on α-glucosidase and α-amylase, which could be the natural sources of α-glucosidase inhibitor with less gastrointestinal side effects.

Key words: *Pyrrosia lingua*, α-glucosidase, α-amylase, acarbose, extract

2019 年全球 20~79 岁糖尿病患者约 4.63 亿，中国约 1.164 亿（International Diabetes Federation, 2019），糖尿病已成为的严重威胁人类健康的第三大疾病（杨文英，2018）。餐后血糖持续升高是引起糖尿病患者血管内皮损伤、视网膜病变等并发症的主要原因，有效控制餐后血糖上升有利于防治糖尿病及其并发症的发生（中华医学会糖尿病学分会，2018）。以 α-葡萄糖苷酶和 α-淀粉酶为降低餐后血糖有效分子靶标开发的阿卡波糖、伏格列波糖等药物已成为临床降低餐后血糖的首选药物。有研究表明，由于阿卡波糖对 α-淀粉酶具有强抑制作用，长期服用会引起引发肠胃胀气、腹部不适等胃肠道副作用（苏青，2018；袁向华等，2016），从中药及天然药物中寻找新型高效、副作用小的 α-淀粉酶和 α-葡萄糖苷酶抑制剂已引起医药工作的关注，近年来也取得了一系列的研究成果（范莉等，2016）。

石韦（*Pyrrosia lingua*）为水龙骨科石韦属植物，别名石剑、石苇，主产区为广东、福建、台湾等地，具有通淋利水、泄热清肺等功效，临床用于治疗淋痛、尿血、尿路结石、肾炎等（国家药典委员会，2015）。石韦为民间防治糖尿病的常用中草药（周悦，2016），现代药理研究也证实石韦可影响小鼠血糖、糖耐量（王兵和黄传贵，2008）、改善糖尿病肾病（刘绪林等，2018）。此外，本课题组前期对梅州客家地区特色和优势药用植物进行了体外降血糖活性初步筛选，发现石韦具有较好的体外降血糖活性。为进一步明确石韦对 α-葡萄糖苷酶和 α-淀粉酶抑制作用和作用机制，本研究以阿卡波糖为阳性对照，4-硝基苯-α-D-吡喃葡萄糖苷和淀粉为底物，评价石韦 95%乙醇提取物的不同极性萃取物对 α-葡萄糖苷酶和 α-淀粉酶的抑制活性，并对活性最强的萃取物通过酶促动力学方法与 Lineweaver-Burk 曲线明确其 α-葡萄糖苷酶的抑制作用类型，为进一步开展石韦降血糖方面的化学成分和药效学研究提供科学依据。

1　材料与方法

1.1　材料

石韦于 2016 年 4 月采自广东省梅州市阴那山自然保护区，经嘉应学院医学院客家药用生物资源研究所张声源副教授鉴定为水龙骨科（*Polypodiaceae*）石韦属（*Pyrrosia*）多年生草本植物石韦（*Pyrrosia lingua*）。

1.2　方法

1.2.1　石韦不同极性部位萃取物的制备

石韦 2.0 kg，50 ℃烘干，粉碎过 40 目筛，用 2 倍量的 95%乙醇于超声提取 30 min（200 W，40 kHz，45℃），重复 3 次，浓缩得浸膏（230 g）。200 g 浸膏加蒸馏水混悬，萃取浓缩得石油醚萃取物（25 g），乙酸乙酯萃取物（66 g），正丁醇萃取物（53 g），水萃取物（50 g）。

1.2.2　对 α-淀粉酶的抑制活性

参照丁华杰等（2020）的 DNS 法，测定不同极性部位萃取物对 α-淀粉酶的抑制活性，重复 3 次，以阿卡波糖为阳性对照。

1.2.3　对 α-葡萄糖苷酶的抑制活性

参照张声源等（2018）的 pNPG 法，测定不同极性部位萃取物对 α-葡萄糖苷酶的抑制活性，重复 3 次，以阿卡波糖为阳性对照。

1.2.4　对 α-葡萄糖苷酶抑制作用的动力学试验

1.2.4.1　α-葡萄糖苷酶酶活力和反应时间的确定

参照温正辉等（2019）的方法，测定 4.0 $mmol \cdot L^{-1}$ pNPG 溶液在不同酶活力（0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.12 $U \cdot mL^{-1}$）条件下的酶促反应初速率。以时间为横坐标，pNP 峰面积为纵坐标作图。

1.2.4.2　α-葡萄糖苷酶抑制类型的研究

参考赖小燕等（2016），李波等（2015），测定样品溶液为 0、5、7 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 在 pNPG 溶液为 4.0 $mmol \cdot L^{-1}$ 、α-葡萄糖苷酶活力为 0.06、0.10、0.14、0.18、0.22 $U \cdot mL^{-1}$ 的反应初速率。以酶活力为横坐标，反应初速率为纵坐标作图，判断其可逆或不可逆抑制类型。

可逆性抑制类型包括竞争性抑制、非竞争性抑制、反竞争性抑制和混合型抑制四种类型（宋菲等，2019）。测定样品溶液为 0、5、7 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 在 0.1 $U \cdot mL^{-1}$ α-葡萄糖苷酶、pNPG 浓度为 1、2、4、8、16 $mmol \cdot L^{-1}$ 的反应初速率。以 pNPG 浓度的倒数为横坐标，反应初速率的倒数为纵坐标，绘制 Lineweaver-Burk 曲线，判断其具体抑制类型。

1.3　数据统计分析

实验重复 3 次，采用 Origin 8.5 软件进行数据处理，结果以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，并得到相应的半数抑制浓度（IC_{50}）。利用单因素方差分析和 Duncan 法检验多组数据间差异的显著性（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）。

2　结果与分析

2.1　石韦萃取物对 α-淀粉酶的抑制活性

由图 1 可知，石韦不同极性萃取物和阿卡波糖对 α-淀粉酶均具有一定的抑制作用，抑制率随质量浓度的增大而升高，呈一定的量效关系。不同极性萃取物中，水萃取物对 α-淀粉酶抑制活性最强，其 IC_{50} 值为（48.40 ± 0.32）$\mu g \cdot mL^{-1}$，显著低于正丁醇萃取物（530.89 ± 6.95）$\mu g \cdot mL^{-1}$、乙酸乙酯萃取物（4929.36 ± 1.56）$\mu g \cdot mL^{-1}$、石油醚萃取物（50148.70 ± 1.94）$\mu g \cdot mL^{-1}$（$P<0.05$）。

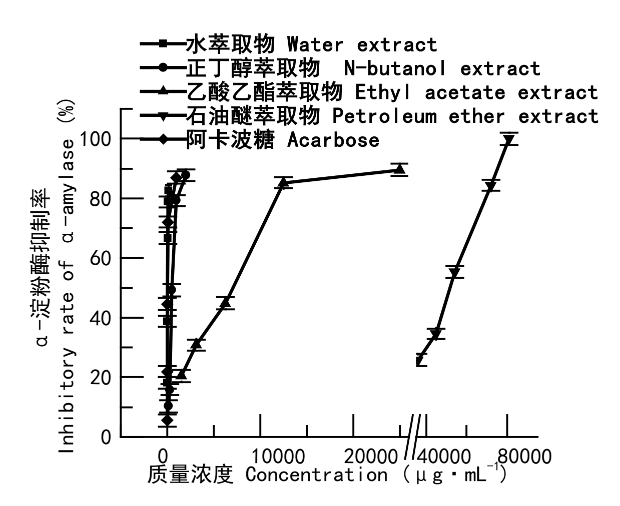


图 1　石韦不同极性萃取物对 α-淀粉酶的抑制效果

Fig.1　Effect of different solvent extracts from *Pyrrosia lingua* on the inhibitory rates of α-amylase

2.2　石韦萃取物对 α-葡萄糖苷酶的抑制活性

由图 2 可知，石韦不同极性萃取物和阿卡波糖对 α-葡萄糖苷酶均具有一定的抑制作用，抑制率随质量浓度的增大而升高，呈一定的量效关系。在不同极性萃取物中，水萃取物对 α-淀粉酶抑制活性最强，其 IC_{50} 值为（4.71 ± 0.72）μg·mL^{-1}，显著低于正丁醇萃取物（25.35 ± 0.12）μg·mL^{-1}、乙酸乙酯萃取物（193.77 ± 1.81）μg·mL^{-1}、石油醚萃取物（388.48 ± 4.71）μg·mL^{-1}、阿卡波糖（2857.36 ± 1.35）μg·mL^{-1}（$P<0.05$）。

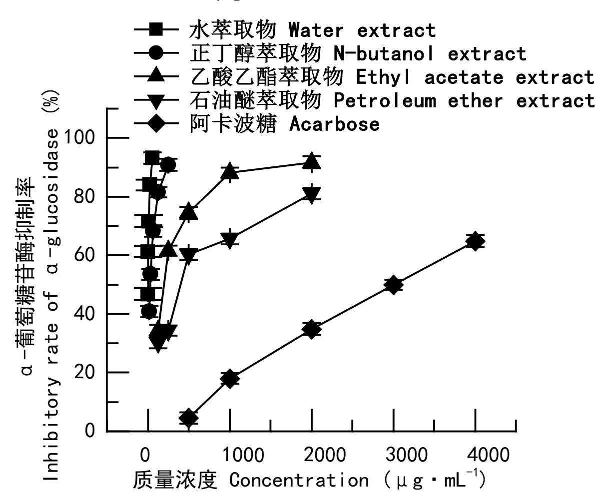


图 2　石韦不同极性萃取物对 α-葡萄糖苷酶的抑制效果

Fig.2　Effect of different solvent extracts from *Pyrrosia lingua* (Thunb.) Farwell on the inhibitory rates of α-glucosidase

2.3　石韦水萃取物对 α-葡萄糖苷酶的抑制类型

2.3.1　α-葡萄糖苷酶酶活力和反应时间的确定

由图 3 可知，在反应时间 0~10 min 范围内，0.02~0.12 U·mL^{-1} 酶活力的酶促反应进程曲线均具有良好的线性关系（各曲线在 0~10 min 进行线性拟合，R^2 均达到 0.999），呈现匀速状态，故确定初速率测定采样时间点为 10 min。

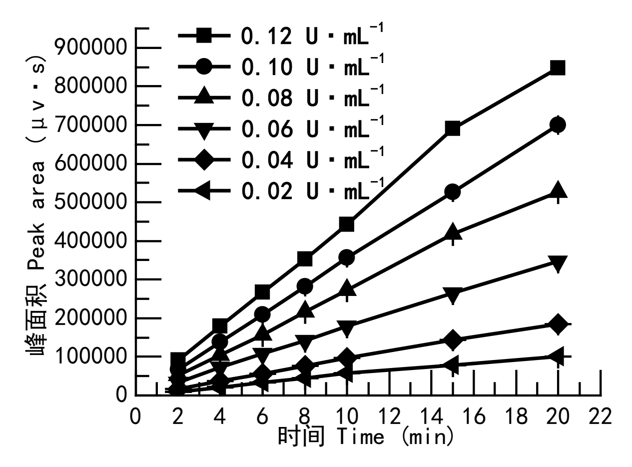


图 3　不同 α-葡萄糖苷酶活力的酶促反应动力学进程曲线

Fig.3　Enzymatic reaction process curves of α-glucosidase at different concentrations

2.3.2　可逆或不可逆抑制类型的确定

由图 4 可知，石韦水萃取物浓度为 0、5、7 μg·mL^{-1} 所得的直线均通过原点，且随石韦水萃取物质量浓度增大，直线的斜率越低，反应初速率降低，为典型的可逆性抑制特征图，由此可得石韦水萃取物对 *α*-葡萄糖苷酶属于典型的可逆性抑制。

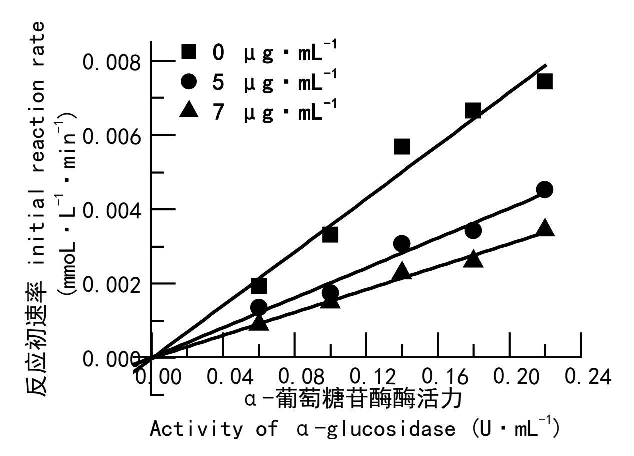


图 4　石韦水萃取物对 α-葡萄糖苷酶的抑制动力学曲线

Fig. 4　Inhibition kinetics curve of water extract of *Pyrrosia lingua* (Thunb.) Farwell towards α-glucosidase

2.3.3　竞争性、非竞争性、反竞争性和混合型抑制类型的确定

由图 5 可知，三组直线交于纵轴，最大反应速率 V_{max} 不变，为 0.0066 mmoL·L^{-1}·min^{-1}，斜率（米氏常数 Km）随抑制剂质量浓度的增大而增大，为典型的竞争性类型，表明石韦水萃取物对 α-葡萄糖苷酶抑制作用为竞争性抑制。

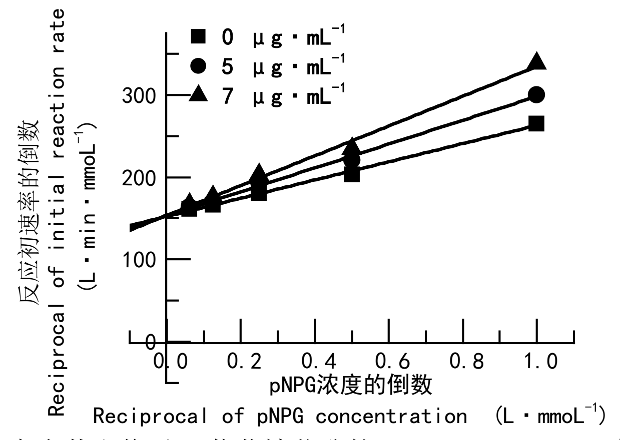


图 5　石韦水萃取物对 α-葡萄糖苷酶的 Lineweaver-Burk 双倒数曲线

Fig.5　Lineweaver-Burk curve of α-glucosidase of water extract of *Pyrrosia lingua* (Thunb.) Farwell

3　讨论与结论

石韦为民间防治糖尿病的常用中草药（周悦，2016），现代药理研究显示石韦可影响小鼠血糖、糖耐量（王兵和黄传贵，2008）、改善糖尿病肾病（刘绪林等，2018），但其作用靶点是否与抑制 α-葡萄糖苷酶和 α-淀粉酶的研究未见报道。实验首次发现石韦 95%乙醇提取物的不同溶剂萃取物对 α-葡萄糖苷酶和 α-淀粉酶具有良好的抑制活性，丰富了石韦发挥降血糖作用的靶点研究。

目前临床常用的 α-葡萄糖苷酶抑制剂由于对 α-淀粉酶的过度抑制，常导致胃肠道副作用（李波等，2015），研究表明其抑制作用强度与假双糖结构连接的葡萄糖分子数目有关（顾觉奋和陈紫娟，2009）。本实验对石韦 95%乙醇提取物的不同溶剂萃取物开展较为系统的体外 α-葡萄糖苷酶和 α-淀粉酶抑制活性评价，结果显示，石韦各萃取物对 α-葡萄糖苷酶和 α-淀粉酶抑制活性大小均为水萃取物>正丁醇萃取物>乙酸乙酯萃取物>石油醚萃取物（$P<0.05$），且活性最强的水萃取物对 α-葡萄糖苷酶的抑制类型为竞争性抑制，与阳性对照阿卡波糖相同，可能与石韦中具有与阿卡波糖抑制 α-葡萄糖苷酶和 α-淀粉酶所必须的假双糖结构有关，该结构由环己糖醇及氨基糖构成，为极性大的寡糖类似物（顾觉奋和陈紫娟，2009），

但石韦在体内对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用是否与阿卡波糖对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用相同，还需要进一步深入研究。此外，结果表明石韦萃取物对 α-葡萄糖苷酶的抑制活性较强，而 α-淀粉酶抑制活性较弱，可能与石韦中发挥 α-淀粉酶抑制活性物质结构连接的葡萄糖分子数目与阿卡波糖连接葡萄糖分子数目不同有关。

本研究揭示了石韦 95%乙醇提取物的不同溶剂萃取物中水萃取物具有最强的 α-葡萄糖苷酶和 α-淀粉酶的抑制活性，且对 α-葡萄糖苷酶为可逆竞争性抑制，表明石韦大极性化学部位中富含抑制 α-葡萄糖苷酶和 α-淀粉酶的活性成分，是天然的、胃肠道副作用小的 α-葡萄糖苷酶抑制剂来源。但石韦中抑制 α-葡萄糖苷酶和 α-淀粉酶的具体活性成分、体内外作用机制以及构效关系等还不明确，后续研究应重点对大极性化学部位开展系统的化学成分、作用机制、构效关系等研究，有望阐明石韦降血糖作用的科学内涵。

参考文献

DING HJ, YE Y, AN H, et al., 2020. Extraction of resveratrol from *Polygonum cuspidatum* and its inhibition of α-amylase and α-glucosidase activity [J]. Chin Cond, 45(2): 176-181. [丁华杰， 叶云，安欢，等，2020. 虎杖白藜芦醇的提取及抑制 α-淀粉酶和 α-葡萄糖苷酶活性的研究 [J]. 中国调味品， 2020, 45(2): 176-181.]

FAN L, WANG YL, TANG L, 2016. Review on screening methods for alpha-glucosidase inhibitors from natural resources [J]. Nat Prod Res Dev, 28(2): 313-321. [范莉， 王业玲， 唐丽，2016. 天然来源 α-葡萄糖苷酶抑制剂筛选方法的研究进展 [J]. 天然产物研究与开发，28(2): 313-321.]

GU JF, CHEN ZJ, 2009. The stud ies and applications of glucosidase inhibitors [J]. Progr Pharmac Sci, 33(2): 62-67. [顾觉奋，陈紫娟，2009. α-葡萄糖苷酶抑制剂的研究及应用 [J]. 药学进展，33(2): 62-67.]

International Diabetes Federation, 2020. IDF diabetes atlas 9th ed [EB/OL]. (2020-02-16).https://diabetesattlas.org/en.html. [国际糖尿病联合会，2020. 第 9 版糖尿病地图集 [EB/OL]. (2020-02-16). https://diabetesattlas.org/en.html.]

LAI XY, JIANG ZD, NI H, et al., 2016. Study on α-glucosidase inhibitory activity of the flavonoids extract from *Camellia* bee pollen [J]. Sci Technol Food Ind, 37(5): 353-357. [赖小燕，姜泽东， 倪辉， 等， 2016. 茶花粉黄酮对 α-葡萄糖苷酶抑制作用的研究 [J]. 食品工业科技， 37(5): 353-357.]

LI B, BAO YH, GAO F, et al., 2015. Inhibitory effect of polyphenols from *Korean* pine cone lamella on α-amylase and α-glucosidase [J]. Sci Technol Food Ind, 36(1): 63-65. [李波， 包怡红， 高锋， 等， 2015. 红松松球鳞片多酚对 α-淀粉酶和 α-葡萄糖苷酶的抑制作用 [J]. 食品工业科技， 36(1): 63-65.]

LIU XL, LIU WP, WANG LL, et al., 2018. Effects of flavonoids from *Pyrrosiae folium* on pathological changes and inflammatory response of diabetic nephropathy [J]. Chin J Chin Mat Med, 43(11): 2352-2357. [刘绪林， 刘文萍， 王丽丽等， 2018. 石韦黄酮组分改善糖尿病肾病病理及减轻炎症反应作用研究 [J]. 中国中药杂志， 43(11): 2352-2357.]

National Pharmacopoeia Commission, 2015. Pharmacopoeia of the People’s Republic of China（Part I） [S]. Beijing: China Medical Science Press: 90. [国家药典委员会， 2015. 中华人民共和国药典（一部） [S]. 北京： 中国医药科技出版社： 90.]

SONG F, ZHANG YF, GUO YR, et al., 2019. Inhibitory effects of Areca Nut extract on the activity of α-glucosidase [J]. Food Res Dev, 40(13): 78-83. [宋菲，张玉锋，郭玉如，等，2019. 槟榔提取物对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用研究 [J]. 食品研究与开发， 40(13): 78-83.]

SU Q, 2018. Adverse drug reactions of α-glucosidase inhibitors combined with other drugs [J].

Drug Eval, 15(23): 3-8. [苏青， 2018. α-葡萄糖苷酶抑制剂与常见药物联用的不良反应[J].药品评价，2018, 15(23): 3-8.]
WANG B, HUANG CG, 2008. Experimental study on hypoglycemic effect of polysaccharide from *Pyrrosia chinensis* [J]. Asia-Pacific Tradit Med, 4(8): 33-34. [王兵， 黄传贵， 2008. 石韦多糖降血糖作用的实验研究 [J]. 亚太传统医药， 2008, 4(8): 33-34.]
WEN ZH, LIN MD, YU SP, et al., 2019. Study on inhibitory effects of ethanol extract of different medicinal parts from *Syzygium jambos* on the activities of α-glycosidase and α-amylase [J]. Chin Pharm, 30(23): 3246-3251. [温正辉，凌梅娣， 余思萍， 等， 2019. 蒲桃不同药用部位乙醇萃取物对 α-葡萄糖苷酶和 α-淀粉酶活性的抑制作用研究 [J]. 中国药房， 30(23): 3246-3251.]
YANG WY, 2018. Epidemiology and trends in diabetes in China [J]. Sci Sin Vitae, 48(8): 812–819. [杨文英， 2018. 中国糖尿病的流行特点及变化趋势 [J]. 中国科学:生命科学， 48(8): 812-819.]
YUAN XH, ZHOU YL, GOU X, et al., 2016. Researches on inhibition kinetics of pancreatic α-amylase by acarbose [J]. World Sci-Technol ResDev, 38(1): 117-121. [袁向华， 周艳玲， 勾洵，等，2016. 阿卡波糖对胰 α-淀粉酶的抑制动力学研究 [J]. 世界科技研究与发展，38(1): 117-121.]
ZHANG SY, ZHUANG YB, LIN DD, et al., 2018. Chemical constituents from α-glucosidase inhibitory active part in stems and leaves of *Syzygium jambos* [J]. Nat Prod Res Dev, 30(11): 1950-1956. [张声源， 庄远杯， 林大都， 等， 2018. 蒲桃枝叶抑制 α-葡萄糖苷酶活性部位及其化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发， 30(11): 1950-1956.]
ZHOU Y, 2016. Investigation on traditional Chinese medicinal plants for prevention and treatment of diabetes mellitus [D]. Beijing: MinZu University of China: 182-183. [周悦， 2016. 中国民间防治糖尿病传统药用植物调查 [D]. 北京： 中央民族大学： 182-183.]